Original Article / Özgün Makale

MEDICINE PALLIATIVE CARE

DOI: 10.47582/jompac.1008477

J Med Palliat Care 2021; 2(4): 136-142

Ratlarda bleomisin ile oluşturulan deneysel akciğer fibrozisi modelinde erdostein ve N-asetilsistein'in fibrozis üzerine etkilerinin incelenmesi

Investigation of the effects of erdosteine and N-acetylcysteine on fibrosis bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats

Mesut Demirköse[1], Ersin Şükrü Erden[2]

[1]Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları, Ankara, Türkiye
[2]Elazığ Özel Medline Hospital, Göğüs hastalıkları, Elazığ, Türkiye

Cite this article as/Bu makaleye atıf için: Demirköse M, Erden EŞ. Ratlarda bleomisin ile oluşturulan deneysel akciğer fibrozisi modelinde erdostein ve N-asetilsistein'in fibrozis üzerine etkilerinin incelenmesi. J Med Palliat Care 2021; 2(4): 136-142.

ÖZ

Amaç: İdiyopatik pulmoner fibrozis (İPF) etyolojisi bilinmeyen, progresif seyirli, etkili bir tedavi seçeneği olmayan bir İnterstisyel Akciğer Hastalığı'dır. Bleomisin (BLM) ile oluşturulan akciğer fibrozis modeli, insanlardaki İPF'nin değerlendirilmesi için kullanılan en önemli modeldir. Erdostein (ERD) ve N-asetilsistein (NAC) sülfhidril içeren antioksidanlardır. Bu çalışmada bu ajanların BLM ile oluşturulan fibrozis üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya alınan ratlar 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (n=7), 0. günde intratrakeal (i.t.) salin, BLM-I (n=5), BLM-II (n=6), ERD (n=6), ve NAC (n=7), gruplarına 0. günde 7,5 Ü/kg BLM i.t. verildi. 14. günden 29. güne kadar BLM-II grubuna distile su, ERD grubuna ERD (10 mg/kg/gün) ve NAC grubuna NAC (3 mmol/kg/gün) peroral verildi. BLM-I grubu için 14. günde, diğerleri için 29. günde çalışma sonlandırıldı. Bronkoalveoler lavajda (BAL) Malondialdehit (MDA), inflamatuvar hücre sayımı, serumda Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS), Tumor Necrosis Factor Alfa (TNFα), Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1), Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MİP 2), Matrix Metalloproteinase 1 (MMP 1), MMP 7 çalışıldı. Akciğer dokusunda hidroksiprolin ölçümü ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Bulgular: Nötrofil düzeyleri, ERD grubunda BLM I, BLM II, NAC gruplarına göre anlamlı düşük bulundu (Sırasıyla; p=0,004, p=0,015, p=0,022). Lenfosit düzeyleri, ERD, NAC gruplarında BLM I'e göre anlamlı düşük bulundu (Sırasıyla; p=0,030, p=0,010). Akciğer dokusu fibrozis derecesi, ERD grubunda BLM I, BLM II, NAC gruplarına göre anlamlı düşük bulundu (p<0,001). TAS düzeyleri, ERD grubunda BLM I-II, NAC gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu (BLM II için p=0,002, diğerleri için p<0,001). TOS düzeyleri, ERD grubunda BLM I-II, NAC gruplarına göre anlamlı düşük bulundu (Sırasıyla; p<0,001, p=0,009, p=0,025). MİP 2 düzeyleri, ERD grubunda BLM I grubuna göre anlamlı düşük bulundu (p=0,004). MMP 1 düzeyleri, ERD grubunda BLM I-II gruplarına göre anlamlı düşük bulundu (Sırasıyla; p=0,007, p=0,022). MDA düzeyleri, ERD grubunda BLM I grubuna göre anlamlı düşük bulundu (p=0,026). Hidroksiprolin düzeyleri, ERD, NAC gruplarında BLM I grubuna göre anlamlı düşük bulundu (Sırasıyla; p=0,001, p=0,003).

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları ERD'in BLM ile oluşturulan fibrozis üzerine tedavi edici etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu etkiyi akciğerde çeşitli kemokin ve kollagenaz düzeylerini ve inflamatuvar hücre birikimini azaltarak, oksidan/antioksidan dengesini düzenleyerek gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer fibrozisi, bleomisin, erdostein, N-asetilsistein, rat

ABSTRACT

Aim: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive Interstitial Lung Disease of unknown etiology, and there is no effective treatment option. Bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis model is the most important model used for the evaluation of IPF in human. Erdosteine (ERD) and N-acetylcysteine (NAC) are sulfhydryl-containing antioxidants. The aim of this study was to investigate the efficacy of these agents on fibrosis created by BLM.

Material and Method: The rats were divided into 5 groups. Intratracheal (IT) saline was given to the control group (n=7), and 7.5 U/kg IT BLM to BLM-I (n=5), BLM-II (n=6), ERD (n=6) and NAC (n=7) groups on day 0. Distilled water to BLM -II group, ERD (10 mg/kg/day) to ERD group and NAC (3 mmol/kg/day) to NAC group was given perorally from day 14 until day 29. Study was terminated on day 14 for BLM-I group and on day 29 for other groups. Malondialdehit (MDA) measurement and inflammatory cell count in BAL fluid, Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS), Tumor Necrosis Factor Alfa (TNFα), Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1), Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP 2), Matrix Metalloproteinase 1 (MMP 1), MMP 7 measurement in serum were performed. Hydroxyproline levels were measured and histopathological examination was performed in lung tissue.

Results: Neutrophil levels were significantly lower in ERD group than BLM I, BLM II, and NAC groups (p=0.004, p=0.015, and p=0.022, respectively). Lympohcyte levels were significantly lower in ERD and NAC groups than BLM I group (p=0.030, p=0.010, respectively). The degree of fibrosis of the lung tissue was significantly lower in ERD group than in BLM I, BLM II, and NAC groups (p<0.001). TAS levels were significantly higher in ERD group than BLM I, BLM II, and NAC groups (p=0.002 for BLM II, p<0.001 for other groups). TOS levels were significantly lower in ERD group than BLM I, BLM II, and NAC groups (p<0.001, p=0.009, p=0.025, respectively). MIP 2 levels were significantly lower in ERD group than BLM I (p=0.004). MMP 1 levels were significantly lower in ERD group than BLM I and BLM II groups. (p=0.007, p=0.022, respectively). MDA levels were significantly lower in ERD group than BLM I (p=0.026). Hydroxypirolin levels were significantly lower in ERD and NAC groups than BLM I (p=0.001, p=0.003, respectively).

Conclusion: Our results showed that ERD has therapeutic effects on fibrosis induced by BLM. It can create this effect by reducing inflammatory cell accumulation, various chemokines and collagenase levels in the lung, and regulating oxidant/antioxidant balance.

Keywords: Bleomycin, erdosteine, N-acetylcysteine, pulmonary fibrosis, rats

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Mesut Demirköse, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları, Ankara, Türkiye
E-mail/E-posta: mesutdemirkose@hotmail.com
Received/Geliş: 12.10.2021 **Accepted/Kabul:** 17.12.2021

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

GİRİŞ

İnterstisyel akciğer hastalığı (İAH) olarak da adlandırılan diffüz parankimal akciğer hastalığı (DPAH) klinik, radyografik, fizyolojik veya patolojik faktörler temelinde sınıflandırılan akciğer hastalıklarını tanımlar (1). Diffüz parankimal akciğer hastalığı (DPAH) 200 kadar hastalığı içeren, akciğer parankimi, hava yolları, vasküler yapıları ve nadiren de plevrayı etkileyen heterojen bir grup hastalıktır (2). Bu hastalıklar; nedeni bilinen DPAH, idiyopatik intertisyel pnömoniler (İİP), granülamatöz DPAH ve diğer formlar olmak üzere başlıca dört başlık altında değerlendirilmektedir (3). İdiyopatik pulmoner fibrozis major idiyopatik intertisyel pnömonilerin en sık karşılaşılan formudur ve patogenezi tam aydınlatılamamış, etyolojisi bilinmeyen, sık görülen, genellikle ölümcül seyreden ve halen kullanılmakta olan tedaviler hastalığın prognozu üzerine çok az etkilidir (4,5).

İPF'nin prevalansı, Amerika Birleşik Devletleri'nde 14 – 63 /100.000, Avrupa da 1,25 – 23,4 /100.000 bulunmuştur (6). Ülkemizde Türk Toraks Derneği tarafından yapılan "Diffüz Parankimal Akciğer Hastalıkları" çalışmasında İPF prevelansı, DPAH hastalıkları içerisinde %19,9 olarak saptanmıştır. İPF'nin erkeklerde kadınlardan daha sık görüldüğü kabul edilmektedir ve ülkemizde erkek kadın oranı (E/K) 1,53 olarak saptanmıştır (7).

İPF etiyolojisi bilinmemekle birlikte hastalığın gelişiminde bazı potansiyel risk faktörleri tanımlanmıştır. Çevresel risk faktörlerinden odun, metal tozları, taş, kum, mesleksel maruziyetler, gastroözafageal reflü'ye bağlı oluşan kronik aspirasyon, genetik faktörler (Alfa-1 antitripsin, anjiotensin dönüştürücü enzim gibi), otoimmunite potansiyel risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. İPF komplex bir hastalıktır , patogenezinde rol oynadığı düşünülen muhtemel mekanizmalar hala net bir şekilde kanıtlanamamıştır. İdiyopatik pulmoner fibrozis genellikle sinsi başlangıçlı ve progresif seyirlidir. Hastalık klinik olarak; subklinik İPF, yavaş progresif İPF, hızlı progresif İPF ve alevlenmeler olarak dört başlık altında değerlendirilmektedir. Alevlenmeler; enfeksiyon ya da kalp yetmezliği gibi sebeplere bağlı olmaksızın semptomlarda, akciğer fonksiyonlarında ve radyolojik bulgularda, birkaç gün veya hafta içinde bozulma olarak tanımlanmıştır (8,9).

İPF'de etkinliği kanıtlanmamış, sınırlı sayıda tedavi seçeneği bulunmaktadır. İnflamatuar ve otoimmün bir hastalık olduğu düşünüldüğü için hastalığın tedavisinde, kortikosteroidler, antiinflamatuar ve sitotoksik ilaçlar kullanılmıştır. Yıllardır etkinlikleri kanıtlanmamasına rağmen kortikosteroidler İPF'de en çok kullanılan ilaçlardır. 2011 yılında yayınlanan kılavuza göre (10), stabil İPF'de farmakolojik tedavi verilmesi benimsenmemiş, nonfarmakolojik tedavilerden uzun süreli oksijen tedavisi, rehabilitasyon ve transplantasyon yapılabileceği, ayrıca akut alevlenme olan olgularda kortikosteroid ve reflü tedavisi verilebileceği benimsenmiştir. Son yıllarda İPF tedavisinde kullanılan, akciğer parenkimindeki fibrozisin progresyonunu engelleyebilen antifibrotik ajanlar pirfenidon ve nintedanib hastalığın tedavisinden ziyade, fonksiyon kaybını yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatmış ve sağkalımda kısmi uzama yapabilmiştir (11). Yapılan çalışmalarda, akciğer transplantasyonunun İPF'li hastalarda yaşam süresini uzatma ihtimali olan tek tedavi yöntemi olduğu bildirilmişitir (12).

Deneysel hayvan modellerinde akciğer fibrozisi üzerine erdostein (ERD) ve N-asetilsistein'in (NAC) etkinliğini değerlendirmek üzere çok sayıda çalışma yapılmıştır (13,14). Bu çalışmalardan bir kısmında ilaç uygulama ve çalışma süresi kısa olup (14 gün vb.), daha uzun süreli çalışmalarda da BLM uygulaması ile birlikte tedavi verilerek değerlendirme yapılmıştır.

Bleomycin (BLM) akciğerde inflamasyona ve fibrotik reaksiyona neden olur. Bu nedenle potansiyel antifibrotik ajanların etkilerini değerlendirmek için deneysel pulmoner fibrozis oluşturmak amacıyla sık kullanılan bir ajandır (15). ERD antioksidan etkinliği olan ve aktif metobiliti N-thioglycolylhomocysteine (Met I) olan bir tiol bileşiğidir. Antioksidan özelliklerinin yanı sıra mukoaktif ve bakteri adhezyonunu azaltıcı özelliği vardır (16). Çalışmalarda ERD'in deney hayvanlarında hava yolu sekresyonlarını artırdığı, insanlarda ise sigara ile oluşan alfa1-antitripsin'in inaktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (17,18). NAC hidrojen peroksit ile gelişen epitel hücre hasarını ve sigaranın neden olduğu inflamatuar süreci baskılar (19). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda yapılan çalışmalarda NAC'ın balgam viskositesinde azalma, ekspektorasyonda kolaylık, öksürük ve balgam hacminde artış, nefes darlığı ve alevlenme sayısında azalma gibi etkilerinin olduğu gösterilmiştir (20).

Bizim literatür bilgimize göre BLM uygulaması ile akciğerlerde fibrozisin oluşmasından sonra geç fibrozis döneminde tedavi verilen bir çalışma mevcut değildir. Klinik pratikte pulmoner fibrozis'li hastalar genellikle semptomları ortaya çıktıktan sonra hekime gelmekte ve bu sırada da hastaların akciğerlerinde fibrozis gelişmiş (ileri evre) olmaktadır. Bu nedenle, biz bu çalışma ile akciğerlerde fibrozis tam olarak oluştuktan sonra erdostein ve NAC tedavisi vererek bu ajanların geç fibrozis döneminde herhangi bir teröpatik etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (2012-09/09-6).

Bu çalışmada ağırlıkları 250 gr'ın üzerinde olan 35 adet erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar rastgele alınarak 7'şerli 5 gruba ayrıldı. Tüm gruplarda intratrakeal (i.t.) uygulama günü 0. gün olarak kabul edildi. 14. günde bleomisin-I (BLM-I) grubundan 5 adet, 29. günde diğer gruplardan 26 adet olmak üzere toplam 31 rat anestezik koşullar altında sakrifiye edilerek gerekli işlemler yapıldı.

Grup 1 (n=7, Kontrol grubu): Bu gruptaki ratlara 0. gün 0,2 ml fosfatla tamponlanmış steril salin (PBS; phosphate buffered saline) i.t. uygulandı. 15. günden itibaren 0,3 ml/gün distile su orogastrik sonda ile uygulanmaya başlandı, 29. güne kadar uygulamaya devam edildi.

Grup 2 (n=5, BLM-I grubu): Bu gruptaki ratlara (n=7), 0. gün 7,5 Ü/kg dozunda BLM i.t. (Nippon Kayaku Co., Japan) verildi. Çalışmanın 10. gününde 1 ve 11. gününde 1 rat ex oldu. 14. günde ratlar anestezik koşullar sakrifiye edilerek gerekli işlemler yapıldı.

Grup 3 (n=6, BLM-II grubu): Bu gruptaki ratlara (n=7), 0. gün 7,5 Ü/kg dozunda BLM i.t. uygulandı. Çalışmanın 12. gününde 1 rat ex oldu. 15. günden itibaren 0,3 ml/gün distile su orogastrik sonda ile uygulanmaya başlandı, 29. güne kadar uygulamaya devam edildi.

Grup 4 (n=6, Erdostein (ERD) grubu): Bu gruptaki ratlara (n=7), 0. gün 7,5 Ü/kg dozunda BLM i.t. uygulandı. Çalışmanın 11. gününde 1 rat ex oldu. 15. günden itibaren 10 mg/kg/gün dozunda erdostein (Sandoz, Türkiye) distile su ile çözülerek orogastrik sonda ile uygulanmaya başlandı, 29. güne kadar uygulamaya devam edildi.

Grup 5 (n=7, N-Asetil sistein (NAC) grubu): Bu gruptaki ratlara 0. gün 7,5 Ü/kg dozunda BLM i.t. uygulandı. 15. günden itibaren 3 mmol/kg /gün dozunda NAC (Hüsnü Arsan, Türkiye) distile su ile çözülerek orogastrik sonda ile uygulanmaya başlandı, 29. güne kadar uygulamaya devam edildi.

Yapılan İşlemler

Tüm ilaç uygulamaları her gün aynı saatte (08:00) yapıldı. BLM ve PBS uygulaması anestezi altında yapıldı. Anestezi için xyalzine (5 mg/kg) ile ketamin (75 mg/kg) aynı enjektöre çekilerek intraperitoneal olarak uygulandı. Daha sonra ratların refleksleri kontrol edilerek anesteziye girmeleri beklendi. Bu sırada BLM"nin 15 U"lik flakon formu PBS içinde çözdürüldü. Anestezi altındaki ratların boyun ön bölgesi orta hat kesisi ile açıldı, cilt altı dokular klemp yardımı ile dikkatlice ekarte edilerek trakeaya ulaşıldı. Trakea içerisine 100 u"lik insülin enjektörü ile girilerek BLM uygulaması yapıldı, BLM"nin akciğere tam ulaşabilmesi için ratların kafa kısmı yukarı kaldırılarak 30 sn kadar beklendi. Kontrol grubuna da aynı şekilde PBS verildi. İşlem bittikten sonra kesi bölgesi sütür ile kapatılarak, enfeksiyon gelişmemesi yönünden günlük antiseptik solüsyon ile silinerek yara bakımı yapıldı.

Çalışmanın 14. gününde BLM-I grubundaki ratlar ve 29. günde diğer gruplardaki ratlar anestezik koşullar altında (xyalzine 5 mg/kg, ketamin 75 mg/kg) medyan sternotomi ile toraks kafesi açıldı, sağ ventrikülden (kalp) yaklaşık 10 ml kan alındı, kan alımı ile sakrifiye edilen ratlara trakeal kanül aracılığıyla akciğerlere BAL işlemi yapıldı (5 kez 1 ml PBS verilerek yaklaşık 4 ml (%80) sıvı geri alındı). BAL işlemi yapıldıktan hemen sonra BAL'da hücre sayımı için gerekli işlemler yapılarak yayma hazırlandı. Ratlardan alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Sol akciğer %10 formaldehit içerisinde fikse edilerek doku kesitleri hazırlandı. Sağ akciğer ise hidroksiprolin ölçümü için kullanıldı. BAL (MDA ölçümü için ayrılan), serum ve akciğer doku örnekleri laboratuvar çalışmasına kadar -80°C"de saklandı.

BAL Malondialdehit (MDA) ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95: 351-358, 1979.) Doku hidroksiprolin tespiti Woessner"in tarif ettiği yöntemle kısmen modifiye edilerek yapıldı (Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.Arch Biochem Biophys. 1961 May;93:440-7.) Bronkoalveoler lavajda hücre sayımı; Bronkoalveoler lavaj sıvısından hazırlanan yaymalar HematoksilenEozin (HE) ve May-Grunwald-Giemsa (MGG) ile boyandı. Her yaymada randomize ortalama 300 adet hücre sayılıp yüzdesi alındı.

Histopatolojik inceleme; Ratların sol akciğerleri histopatolojik değerlendirme için %10 formalin solüsyonunda 24 saat bekletilerek tespit edildi. Tüm akciğeri temsil edecek şekilde sagittal doku örneleri alındı. Rutin doku takibinden sonra parafin blok haline getirildi ve 4 µ kalınlığında kesitler elde edildi. Kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ve fibrozisin değerlendirilmesi için Masson Trichrom (MT) boyasıyla boyandı. Fibrozisin derecelendirmesi; MT ile boyalı kesitlerde 100"lük büyütmede rastgele seçilen 10 alanda Ashcroft skorlamasına (J Clin Pathol 1988;41:467-470) göre yapıldı. Mikroskobik inceleme kör olarak yapıldı.

Serum örneklerinin Total Antioxidant Status (TAS) düzeylerinin ölçümü, Total Oxidant Status (TOS) düzeylerinin ölçümü, Tümor Necrosis Factor-Alfa (TNF-α) düzeylerinin ölçümü, Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-β1) düzeylerinin ölçümü, Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MİP-2) düzeylerinin ölçümü, Matrix Metalloproteinase 1 (MMP 1) düzeylerinin ölçümü ve Matrix Metalloproteinase 7 (MMP 7) düzeylerinin ölçümü kit prosedürlerine uygun olarak çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Değişkenler normal dağılım yönünden Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin analizinde One-Way ANOVA testi, normal dağılıma uymayan değişkenlerin analizinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi ve posthoc test olarak LSD testi kullanıldı.

Tüm istatistiksel veriler için p <0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Tüm gruplarda akciğer dokusunda fibrozis derecesi ve akciğer hidroksiprolin miktarı, serum TGF β1, MIP-2, MMP-1, MMP-7, TNF α düzeyleri, serum TAS, TOS ve BAL MDA düzeyleri ortalama±standart sapma verilerek karşılaştırılmıştır. BAL nötrofil düzeyleri, BLM I, BLM II, NAC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (Sırasıyla; p=0,003, p=0,005, p=0,011). ERD grubunda ise BLM I, BLM II ve NAC gruplarına göre anlamlı düşük bulunmuştur (Sırasıyla; p=0,004, p=0,015, p=0,022). BAL lenfosit düzeyleri, BLM I grubunda ERD ve NAC gruplarına göre anlamlı yüksek bulunurken, (Sırasıyla; p=0,030, p=0,010) NAC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur(p=0,017). Tüm gruplarda BAL'da hücre yüzdeleri, akciğer dokusunda fibrozis derecesi ve akciğer hidroksiprolin miktarı, serum TGF β1, MIP-2, MMP-1, MMP-7, TNF α düzeyleri, serum TAS, TOS ve BAL MDA düzeyleri ortalama±standart sapma olarak **Tablo 1**-**2**'de verilmektedir.

Serum TNF α düzeyleri BLM I, BLM II ve NAC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken (Sırasıyla; p=0,018, p=0,002, p=0,011) grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Serum TAS düzeyleri, BLM I, BLM II ve NAC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur (BLM II grubu için p=0,006, diğer gruplar için p<0,001). ERD grubunda ise BLM I-II ve NAC gruplarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur (BLM II için p=0,002, diğer gruplar için p<0,001). BLM gruplarının Serum TAS düzeyleri karşılaştırıldığında BLM I grubunda BLM II grubuna göre anlamlı düşük olduğu saptanmıştır (p=0,038).

Serum TOS düzeyleri, BLM I grubunda kontrol, ERD ve NAC gruplarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur (Sırasıyla; p=0,002, p<0,001, p=0,032). ERD grubunda BLM II ve NAC gruplarına göre anlamlı düşük bulunmuştur (Sırasıyla; p=0,009 ve p=0,025).

BLM II grubunda ortalama serum TGF-β1 düzeyleri diğer gruplara göre yüksek olmakla birlikte (BLM II ile Kontrol grubu için p=0,051) grupların ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Serum MİP 2 düzeyleri, BLM I grubunda kontrol, ERD ve NAC gruplarına göre anlamlı yüksek bulunurken, (Kontrol grubu için p=0,001, diğer iki grup için p=0,004). BLM II grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0,025).

Serum MMP 1 düzeyleri, BLM I-II ve NAC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (Sırasıyla; p=0,001, p=0,003, p=0,032). ERD grubunda BLM I-II gruplarına göre anlamlı düşük bulunmuştur (Sırasıyla; p=0,007 ve p=0,022). Kontrol grubu ile NAC grubu Serum MMP 7 düzeyleri bakımından karşılaştırıldığın da; NAC grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0.042).

Tablo 1. Tüm gruplarda serum TGF β1, MIP 2, MMP1, MMP7, TNF α, TAS, TOS ve BAL MDA düzeyleri

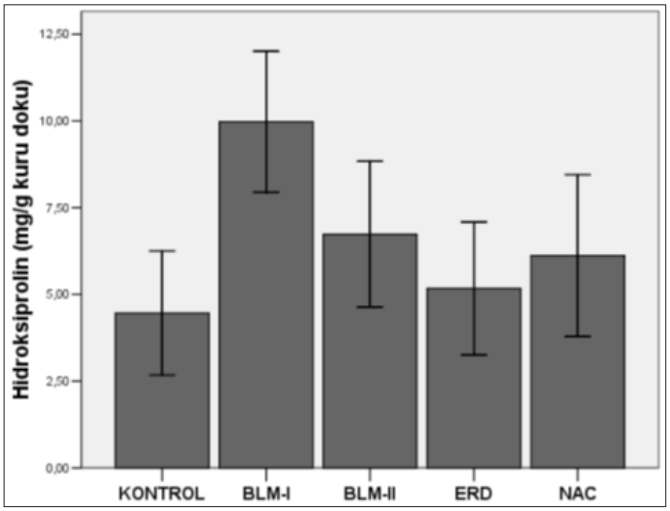
	Kontrol	BLM-1	BLM-2	NAC	ERD
Serum TGF β1(pg/ml)	210,5±14,4	237,1±58,9	246,8±20,9	225,9±19,1	231,6±36,6
Serum MİP-2 (pg/ml)	11,8±2,2	26,2±8,6	20,1±9,7	14,8±4,3	14,4±4,6
Serum MMP-1(pg/ml)	953,6±314,8	1646,3±264,8	1530,7±430,0	1342,8±264,4	1078,5±299,9
Serum MMP-7(pg/ml)	25,4±10,9	48,2±12,0	38,4±6,7	47,6±29,7	27,4±24,5
Serum TNF α (pg/ml)	2,0±0,2	3,7±2,1	2,7±0,3	2,5±0,3	2,5±0,3
Serum TAS (mmol/l)	1,1±0,2	0,4±0,1	0,7±0,2	0,5±0,3	1,2±0,2
Serum TOS(μmol/l)	97,7±22,0	190,2±56,2	143,8±56,6	130,1±50,4	70,3±36,1
BAL MDA (μmol/l)	0,1±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1

Tablo 2. Tüm gruplarda BAL'da hücre düzeyleri, akciğer dokusunda fibrozis derecesi ve akciğer hidroksiprolin miktarı

	Kontrol	BLM I	BLM II	NAC	ERD
Makrofaj (%)	92±4,04	20,00±11,42	64±30,04	57,57±4,04	93,66±11,12
Nötrofil (%)	0,57±0,79	64,80±20,95	29,33±32,49	39,17±30,74	3,00±6,87
Lenfosit (%)	7,43±3,50	15,46±6,66	6,66±5,92	2,85±1,86	3,33±4,32
Fibrozis	0,14±0,38	6,20±0,84	5,33±1,21	5,29±1,38	2,33±1,97
Hidroksiprolin (mg/g kuru doku)	4,47±1,93	9,98±1,64	6,74±2,00	6,12±2,51	5,17±1,82

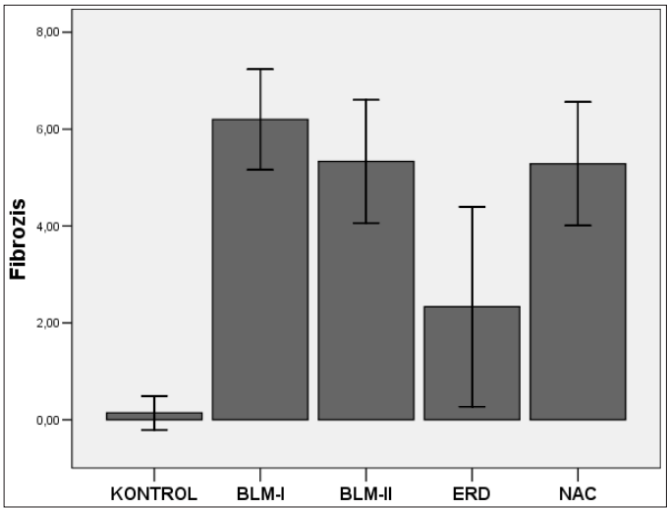
BAL MDA düzeyleri, BLM I grubunda kontrol ve ERD gruplarına göre anlamlı yüksek bulunurken, (Sırasıyla; p=0,010 ve p=0,026) grupların diğer ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Akciğer doku hidroksiprolin düzeyleri, BLM I grubunda kontrol, BLM II, ERD ve NAC gruplarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur (Sırasıyla; p<0,001, p=0,014, p=0,001, p=0,003). ERD grubunda ise ortalama akciğer doku hidroksiprolin düzeyi BLM II ve NAC gruplarından düşük olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (**Şekil 1**).



Şekil 1. Tüm gruplarda akciğer doku hidroksiprolin düzeyleri

Akciğer dokusu fibrozis derecesi BLM I, BLM II, ERD ve NAC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (ERD grubu için p=0,005, diğer gruplar için p<0,001). Fibrozis derecesi ERD grubunda BLM I, BLM II ve NAC gruplarına göre anlamlı düşük bulunmuştur (p<0,001). BLM I ve BLM II arasında ve NAC ile BLM grupları arasında fibrozis derecesi bakımından anlamlı fark bulunmamıştır (**Şekil 2**).



Şekil 2. Tüm gruplardaki doku fibrozis dereceleri

TARTIŞMA

Bu çalışmada BLM ile oluşturulan deneysel akciğer fibrozis modelinde, akciğerlerde inflamasyon ve fibrozis gelişimini takiben geç fibrotik dönemde ERD ve NAC'ın herhangi bir teröpatik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Son zamanlarda İPF patogenizinde miyofibrositlerin rolü daha fazla dikkati çekmektedir. Tip-II pnömositler, fibroblast aktive eden sitokinler "TGF-β1 ve TNF-α" salgılar. İPF'de fibrositler, fibroblastlara benzer rol oynamaktadır (21). Yıldırım ve ark. (14)'nın çalışmasında da i.t BLM verilen ratlarda 14. günde BAL sıvısında total hücre sayısının, nötrofil, makrofaj ve lenfosit sayılarının anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir. NAC ve ERD ile tedavi verilen gruplarda bu artışın baskılandığı görülmüştür. Bu çalışmada i.t. BLM uygulamasının BAL nötrofil oranlarında belirgin artışa neden olduğu ve nötrofil oranının 29. günde hala yüksek olduğu görüldü. ERD tedavisinin BLM enjeksiyonuna bağlı nötrofil artışını 29. günde anlamlı derecede baskıladığı ve NAC tedavisine anlamlı yanıt olmadığı görüldü. BAL lenfosit oranlarının ise 29. günde bakıldığında NAC ve ERD gruplarında BLM I grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları, benzer çalışmalarda olduğu gibi ERD"nin BLM ile oluşturulan akciğer inflamasyonunu baskıladığını göstermektedir.

Makrofaj inflamatuvar protein 2, akciğer hasarına neden olan nötrofil birikiminin potansiyel bir mediatörüdür (22). BLM'nin uygulamasını takiben fibrotik sürecin gelişiminde akciğerde intertisyel alanda inflamatuvar hücreler birikirler (23,24). Çoğu araştırmacı BLM'nin indüklediği fibrotik değişikliklerin gelişimi esnasında akciğerde MCP 1, MİP 1α ve MİP-2 üretiminin arttığını ve bu kemokinlere karşı nötralizan monoklonal antikorlar uygulandığı zaman fibroziste azalmayı göstermişlerdir (25,26). Yara ve ark'ları (27) farelerde BLM ile indüklenen akciğer fibrozisinde MİP-2'nin 3 ve 7. günlerde maksimum düzeye ulaştığını, 14 ve 28. günlerde azaldığını bildirmişlerdir. Hagiwara ve ark. (28) sadece BLM verilen ratlarda MİP -2 seviyelerinin 7. günde pik yaptığını ve sonrasında hızlı bir şekilde azaldığını, NAC 'in bu artışı engellediğini göstermişlerdir. Erden ve ark. (13) BAL MİP -2 düzeylerinin BLM grubunda anlamlı derecede yükseldiğini, ERD tedavisinin bu yükselmeyi engellediğini saptamıştır. Mevcut çalışmada BLM gruplarında 14. ve 29. günde serum MİP-2 düzeyleri kontrol grubuna göre ve 14. günde ERD ve NAC gruplarına göre anlamlı yüksek saptandı. Bu veriler, ERD'in MİP-2 düzeyini azaltarak inflamasyon alanında inflamatuar hücre sayısını azaltabileceğini düşündürebilir.

Malondialdehit biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunu göstermek için sık kullanılan bir tür aldehittir (29). Yüksek olarak bulunması o ortamda lipid peroksidasyonu olduğunu gösterir (30). Yıldırım ve ark. (14) yaptığı çalışmada BLM grubunda akciğer dokusunda MDA düzeylerinde belirgin artış olduğu, NAC ve ERD tedavisi verilen grup-

larda MDA düzeylerinin baskılandığı görülmüştür. Erden ve ark. (11) çalışmasında ERD'nin BLM'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada BLM uygulaması BAL MDA düzeylerinde anlamlı artışa yol açmıştır ve ERD tedavisi de MDA düzeyinde düşmeye neden olmuştur.

Hidroksiprolin düzeyi dokudaki kollejen miktarın tespiti için kullanılan iyi bir biyokimyasal yöntem olarak kabul edilmektedir (29). Erden ve ark. (13)'nın yaptığı bir başka çalışmada BLM uygulamasıyla fibrozis derecesinin kontrol grubuna göre yaklaşık 7 kat arttığı ve ERD tedavisinin bunu anlamlı düzeyde önlediği bildirmiştir, ek olarak BLM"nin akciğer hidroksiprolin içeriğini yaklaşık 2 kat arttırdığı ve ERD tedavisinin bu artışı belirgin olarak engellediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak, BLM gruplarında akciğer fibrozisi ve doku hidroksiprolin düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu. ERD tedavisi verilenlerde doku hidroksiprolin düzeyi düşük, fibrozis skoru anlamlı derecede düşük bulundu.

Tümör nekrozis faktör-α Pulmoner fibrozisin patogenizinden büyük ölçüde sorumlu tutulmuş ve terapötik müdahaleler için potansiyel hedef olarak kabul edilmiştir (23,31,32). TGF-β1 profibrogenik etkisinden dolayı İPF gelişiminde kritik medyatörlerden biri olarak kabul edilir literatürdeki bir çok çalışmada BLM ile indüklenen akciğer fibrozisi sonrası BAL da TNF α ve TGF-β1 düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Serrano-Mollar ve ark. (33)'nın çalışmasında; BLM ile akciğer fibrozisi oluşturulan ratlarda 15. günde BAL TNF-α düzeyinin kontrol ve NAC gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Li ve ark. (34)'nın çalışmasında BLM ile indüklenen akciğer fibrozisinde BLM gruplarında serum TGF-β1 seviyelerinin 9. günde pik yaptığı ve 35. güne kadar yüksekliğini koruduğu ve NAC verilen gruplarda bu artışın baskılandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada serum TNF-α seviyeleri BLM uygulaması ile anlamlı düzeyde artmıştır. NAC ve ERD tedavileri verilen gruplarda BLM I grubuna göre düşük olmakla birlikte TNF-α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamışken TGF-β1 seviyelerinde ise BLM ve tedavi gruplarında kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte, bu seviyelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi

BLM ile oluşturulan akciğer fibrozisinde oksidan/antioksidan dengesizliğinin rol oynadığı savunulmuştur (15). TAS son zamanlarda geliştirilen bir ölçüm yöntemi olup, serumdaki enzimatik olan ve olmayan tüm antioksidanların durumunu yansıtabilmektedir. Oksidatif hasarına yol açan serbest radikal reaksiyonlarına karşı ölçülmektedir (35,36). TOS ise dokuda oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarı yansıtan parametre olarak kullanılmaktadır. Kılıç ve ark. (37) BLM oluşturulan akciğer fibrozisinde, akciğer dokusunda TOS düzeylerini anlamlı yüksek, TAS düzeylerini anlamlı düşük bulmuşlardır. Bu çalışmada BLM uygulaması 14. günde serum TOS düzeylerinde anlamlı artışa, serum TAS düzeylerinde anlamlı düşüşe yol açmıştır. NAC tedavisinin serum TAS, TOS düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi görülmezken; ERD tedavisi serum TAS düzeylerinde anlamlı artışa ve serum TOS düzeylerinde anlamlı düşüşe neden olmuştur.

Matriks metolloproteinazlar (MMPs)'ler her türlü ekstraselüler matriksi parçalama yeteneğine sahip bioaktif moleküllerdir. MMPs'nin yapısal ve fonksiyonel olarak farklı tipleri vardır. İntertisyel kollejenazlar tarafından en fazla MMP-1 eksprese edilir. Henry ve ark. (38) BAL'da MMP-1 düzeylerinin İPF'li hastalarda anlamlı yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda serum MMP-1 düzeyleri BLM uygulaması ile anlamlı düzeyde artmıştır. 29. günde bu düzeylerde bir miktar düşme olmakla birlikte anlamlı yüksekliğini sürdürmüştür. ERD tedavisi serum MMP-1 düzeylerinde anlamlı düşüşe neden olmuştur. Verma ve ark. (29) çalışmasında ratlarda BLM ile indüklenen akciğer fibrozisinde plazma ve BAL'da MMP-7 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, ERD'nin MMP ekspresyonunu inhibe ederek akciğerde fibrozis gelişimini önleyebileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada NAC tedavisinin BLM'ye bağlı gelişen akciğer inflamasyonu ve fibrozisi üzerine anlamlı bir teröpatik etkisi olmamıştır. Buna karşın ERD'nin BLM ile oluşturulan akciğer inflamasyonu ve fibrozis üzerine tedavi edici etkisinin olduğunu görülmüştür. ERD, bu etkiyi akciğerde çeşitli kemokin ve kollagenaz düzeylerini ve inflamatuvar hücre birikimini azaltarak, oksidan/antioksidan dengesini düzenleyerek gösterebilir.

Bu çalışmanın sonuçları, ERD'nin İPF'de ileri fibrosis dönemi de dahil olmak üzere bir tedavi seçeneği olabileceğini öne sürmektedir. Bununla birlikte bu sonuçları destekleyebilecek kapsamlı çalışmalara, özellikle klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

ETİK BEYANLAR

Etik Kurul Onayı: Bu deneysel çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (2012-09/09-6).

Hakem Değerlendirme Süreci: Harici çift kör hakem değerlendirmesi.

Çıkar Çatışması Durumu: Yazarlar bu çalışmada herhangi bir çıkara dayalı ilişki olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Yazar Katkıları: Yazarların tümü; makalenin tasarımına, yürütülmesine, analizine katıldığını ve son sürümünü onayladıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Antoine M, Mlika M. Interstitial Lung Disease. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 3, 2021.
2. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 646-64.
3. Okutan O, Ayten Ö. Tanım ve Sınıflama In: Kartaloğlu Z, Okutan O, editörs. İdiyopatik pulmoner fibrozis güncel tanı ve tedavi rehberi. TÜSAD Eğitim kitapları serisi. İstanbul: G.M. Matbaacılık; 2013.p.2.
4. Goldstein RH, Fine A. Potential therapeutic initiatives for fibrogenic lung diseases. Chest 1995; 108: 848-55.
5. Hunninghake GW, Kalica AR. Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995; 15: 915-8.
6. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. Eur Respir Rev 2012; 21: 355-61.
7. Musellim B, Okumus G, Uzaslan E, et al. Epidemiology and distribution of interstitial lung diseases in Turkey. Clin Respir J 2014; 8: 55-62.
8. Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2007; 176: 636-43.
9. Silva CI, Müller NL, Fujimoto K, et al. Acute exacerbation of chronic interstitial pneumonia: high-resolution computed tomography and pathologic findings. J Thorac Imaging 2007; 22: 221-9.
10. Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. Eur Respir J 2011; 37: 743-6.
11. Ergur GA, Bingöl Z, Kumbasar ÖÖ, ve ark. Türk Toraks Derneği idiyopatik pulmoner fibrozis tanı ve tedavi uzlaşı raporu 2018. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2018.
12. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, et al. International guidelines fort he selection of lung transplant candidates: 2006 update - a concensus report from the pulmonary Scientific Council of the International Society of Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant 2006; 25: 745-55.
13. Erden ES, Kirkil G, Deveci F, et al. Ratlarda bleomisin ile oluşturulan akciğer fibrozisinde erdosteinin inflamasyon ve fibrozis üzerine etkileri [Effects of erdosteine on inflammation and fibrosis in rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin]. Tuberk Toraks 2008; 56: 127-38.
14. Yildirim Z, Kotuk M, Iraz M, et al. Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteine and N-acetylcysteine. Pulm Pharmacol Ther 2005; 18: 367-73.
15. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?. Int J Biochem Cell Biol 2008; 40: 362-82.
16. Moretti M, Bottrighi P, Dallari R, et al. The effect of long-term treatment with erdosteine on chronic obstructive pulmonary disease: the EQUALIFE Study. Drugs Exp Clin Res 2004; 30: 143-52.
17. Inglesi M, Nicola M, Fregnan GB, Bradamante S, Pagani G. Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine. Farmaco 1994; 40: 703-8.
18. Vagliasindi M, Fregnan GB. Erdosteine protection against cigarette smoking-induced functional antiprotease deficiency in human bronchiolo-alveolar structures. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1989; 27: 238-41.
19. van Herwaarden CL, Dekhuijzen PN, van Schayck CP, van Weel C, Molema J. Drug treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Nederlands tijdschrift voor geneeskunde. 1996;140(14):761-5.
20. Türker H. Kronik obstrüktif akciğer hastalığında mukolitikler ve antioksidanlar. In: Umut S ve Erdinç E; eds. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı İstanbul: 2000; 2: 124-7.
21. Erdoğan Y. İdiyopatik interstisyel pnömoniler In: Özlü T, MetintaÇ M, Karadağ M, Kaya A. editörs. Solunum Sistemi ve Hastalıkları 1 ed. İstanbul: istanbul medikal yayıncılık; 2011.p.1069.
22. Keane MP, Standiford TJ, Strieter RM. Chemokines are important cytokines in the pathogenesis of interstitial lung disease. Eur Respir J 1997; 10: 1199-202.
23. Smith RE, Strieter RM, Phan SH, Lukacs N, Kunkel SL. TNF and IL-6 mediate MIP-1alpha expression in bleomycin-induced lung injury. J Leukoc Biol 1998; 64: 528-36.
24. Zhang K, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Phan SH. In situ hybridization analysis of rat lung alpha 1(I) and alpha 2(I) collagen gene expression in pulmonary fibrosis induced by endotracheal bleomycin injection. Lab Invest 1994; 70: 192-202.
25. Smith RE, Strieter RM, Zhang K, et al. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. J Leukoc Biol 1995; 57: 782-7.
26. Keane MP, Belperio JA, Moore TA, et al. Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Immunol 1999; 162: 5511-8.
27. Yara S, Kawakami K, Kudeken N, et al. FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice. Clin Exp Immunol 2001; 124: 77-85.
28. Hagiwara SI, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162: 225-31.
29. Verma R, Kushwah L, Gohel D, Patel M, Marvania T, Balakrishnan S. Evaluating the ameliorative potential of quercetin against the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats. Pulmonary Med 2013; 2013: 921724.
30. Oury TD, Thakker K, Menache M, Chang LY, Crapo JD, Day BJ. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a catalytic antioxidant metalloporphyrin. Am J Respir Cell Mol Biol 2001; 25: 164-9.
31. Piguet PF. Is "tumor necrosis factor" the major effector of pulmonary fibrosis?. Eur Cytokine Netw 1990; 1: 257-8.
32. Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. J Immunol 1993; 150: 4188-96.
33. Serrano-Mollar A, Closa D, Prats N, et al. In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. Br J Pharmacol 2003; 138: 1037-48.
34. Li S, Yang X, Li W, et al. N-acetylcysteine downregulation of lysyl oxidase activity alleviating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Respiration 2012; 84: 509-17.
35. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 2004; 37: 277-85.
36. Işık A, Koca S: Behçet hastaliğinda total antioksidan cevap ve oksidatifstres. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Derg 2006; 20: 415-21.
37. Kilic T, Parlakpinar H, Polat A, et al. Protective and therapeutic effect of molsidomine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. Inflammation 2014; 37: 1167-78.
38. Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. Eur Respir J 2002; 20: 1220-7.